

Fig. 3. — Caso n. 11 dopo un mese di trattamento con INI. Notevole riassorbimento dei focoli caseosi; la cavità non è più visibile.

smatico dei tubercolotici trattati con INI consistono, essenzialmente e principalmente, in una mobilitazione dei valori percentuali della quota albuminica (verso l'alto o verso il basso, a seconda dell'esplicarsi o meno di un effetto terapeutico) cui fa riscontro uno spostamento (rispettivamente verso il basso o verso l'alto) delle quote globuliniche, senza però che sia possibile identificare alcuna frazione globulinica che più evidentemente e più costantemente delle altre assuma in questo senso una particolare importanza. A questo proposito dobbiamo anche tener presente la particolare « fisionomia » della nostra casistica, formata da pazienti a quadro disprotidemico complesso per la contemporanea presenza di componenti essudative e di componenti fibro-produttive nel quadro clinico generale. Con questa riserva, che può aver contribuito a rendere malagevole l'esatta definizione del comportamento delle singole frazioni proteiche, e lasciando impregiudicata la questione di quanto nelle variazioni dello spettro proteico possa essere ricondotto solo in via secondaria alla terapia (migliorate condizioni generali e di nutrizione, ecc.), abbiamo ritenuto più interessante, nei confronti di una analisi minuta delle singole frazioni, procedere alla interpretazione dei nostri risultati mediante lo studio del rapporto A/G e degli indici di labilità e di attività.

**Rapporto albumina/globuline (A/G). Indice di attività (A/Prot. tot.). Indice di labilità (G/Prot. tot.).** — Il quoziente A/G, generalmente inferiore all'unità prima del trattamento, si è mantenuto invariato anche dopo in un buon numero di casi (n. 1, 2, 4, 7, 16, 18); in 4 casi (n. 6, 9, 10, 17) si è assistito ad un netto e progressivo aumento di tale quoziente, mentre tale aumento è stato meno marcato in altri 5 casi (n. 3, 5, 13, 14, 19). In 2 casi (n. 11 e 12) si rileva, dopo un

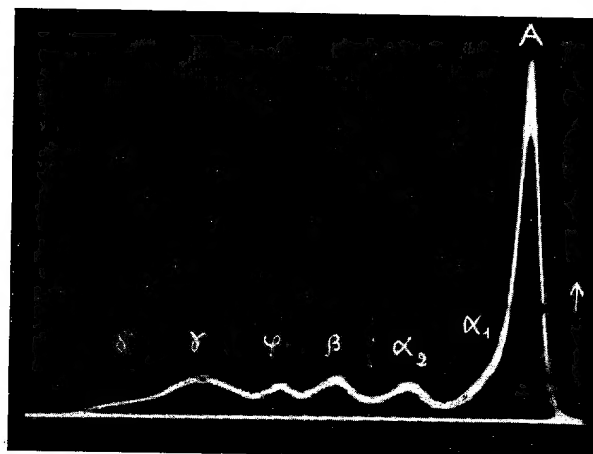


Fig. 4. — In confronto alla fig. 2 è evidente l'aumento dell'albumina con diminuzione delle alfa-globuline.

mese di cura, un discreto aumento del Q. P., che torna però a diminuire nel successivo controllo. Infine, in altri 2 casi (n. 8 e 15) si è verificata una netta diminuzione del rapporto A/G.

Concordano con le variazioni del Q. P. anche quelle dei rapporti A/Prot. tot. e G/Prot. tot., i quali mostrano naturalmente fra di loro un comportamento inverso (l'aumento dell'indice di attività si accompagna alla diminuzione di quello di labilità, e viceversa). Nei casi in cui non si sono avute modificazioni la costanza di questi indici è veramente significativa e costituisce una controprova della esattezza del metodo.

Dove invece le variazioni sono state più sensibili possiamo dire che esse hanno mostrato una notevole concordanza con i rilievi clinici. Infatti i casi n. 6, 9, 10, 17 nei quali l'aumento del quoziente A/G e dell'indice di attività, con relativa diminuzione dell'indice di labilità, sono stati più netti, hanno dimostrato anche dal lato clinico il maggior beneficio non solo sulle condizioni soggettive e generali, ma anche sul reperto radiologico. Analoghe considerazioni valgono per i casi in cui le suddette variazioni sono state meno spiccate ed anche il miglioramento clinico più modesto. Al contrario nel caso n. 15 la diminuzione del rapporto A/G e dell'indice di attività, con aumento dell'indice di labilità, ha coinciso con un netto peggioramento dell'ammalato che è successivamente venuto a morte. Meno evidente è stato invece il peggioramento nel caso n. 8, che si riferisce però ad un malato dimesso anzitempo dietro sua insistenza e di cui ci mancano ulteriori notizie. Degni di nota infine i casi n. 11 e 12 nei quali si è avuto dapprima un aumento del rapporto A/G ed in seguito una nuova diminuzione. Nel primo di questi casi (vedi figure) si è potuto assistere dapprima all'elisione pressoché totale di una ampia caverna apicale, mentre in un secondo tempo la cavità è ritornata bene evidente, tanto da richiedere l'istituzione del pneumotorace.

Riassumendo, possiamo concludere che, per effetto del trattamento con INI, l'esame del quadro proteico ha messo in evidenza, almeno in un certo numero di pazienti della nostra casistica, variazioni che, pur essendo di modesta entità, ci sembrano tuttavia assai significative. Mentre il comportamento della protidemia totale non consente di trarre deduzioni di or-

dine prognostico, le variazioni delle quote albuminiche e globuliniche, chiaramente espresse dalle modificazioni del rapporto A/G e degli indici di attività e di labilità dimostrano una notevole correlazione con l'andamento clinico della malattia: tale correlazione è espressa dall'aumento dell'albumina con diminuzione delle globuline nei casi a decorso favorevole, mentre il comportamento inverso si ha in caso di peggioramento. Queste conclusioni concordano con quelle che si possono ricavare dalla letteratura sul comportamento della protidemia nei tubercolotici trattati con altri chemioterapici ed antibiotici, ai quali l'INI non sembra essere inferiore anche sotto questo punto di vista.

\*\*\*

Durante le remore di stampa della presente nota è apparso, sullo stesso argomento, un lavoro di G. Mul-tari (« Progr. Med. », 8, 653, 1952). Usando il metodo della precipitazione frazionata sec. Howe per la determinazione del quadro proteico plasmatico nei tuber-colotici curati con INI, l'A. giunge a conclusioni che non diversificano sostanzialmente dalle nostre per quanto riguarda il comportamento delle varie frazioni proteiche dopo 1 e 2 mesi di terapia. Interessante il rilievo, notevolmente frequente, di una diminuzione dell'albumina con parallelo aumento delle globuline nei primi giorni di trattamento: l'A. interpreta il fenomeno come legato ad una crisi del quadro proteico plasmatico, di natura probabilmente tossica, che l'INI determinerebbe nella tbc. polmonare.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) Wuhmann e Wunderly: « Die Bluteiweisskörper des Menschen », Ed. Benno Schwabe, Basel, 1952; « Schweiz. Med. Wsch. », 75, 118, 1945.
- 2) Masson: « Rev. de la tub. », 7, 828, 1931.
- 3) Levi, Valceni e Gille: « Rev. de la tub. », 2, 19, 1936.
- 4) Molnar: « Beitr. z. Klin. Tbk. », 89, 83, 1937.
- 5) Anzalone: « Riv. Pat. Clin. Tbc. », 13, 169, 1939.
- 6) Seibert e Nelson: « Am. Rev. of Tuberc. », 47, 66, 1943.
- 7) Babolini: « Ann. Forlanini », 5, 85, 1941.
- 8) Scoz e Guzzi: « Boll. Ist. Principe di Piemonte », 2, 3/4, 1945.
- 9) Gohr e Klement: « Beitr. z. Klin. Tbk. », 104, 455, 1951.
- 10) Monaldi: « Ann. Forlanini », 2, 39, 1937.
- 11) Cocozza: « La Pediatria », 56, 475, 1948.
- 12) Nobile: « Riv. Pat. Clin. Tbc. », 24, 265, 1951.
- 13) Lenzi: « Riv. Pat. Clin. Tbc. », 9, 322, 1937.
- 14) Anzalone: « Riv. Pat. Clin. Tbc. », 12, 545, 1938.
- 15) Gugliemetti e Babolini: « Clin. Med. It. », 69, 495, 1938.
- 16) Dufourt, Paillot, Brion e Battandier: « Compt. Rend. Soc. de Biol. », 138, 562, 1944.
- 17) Seibert e Pfaff: « Arch. Biochem. », 18, 279, 1948.
- 18) Utrilla: « Laboratorii », 6/31, 1/9, 1948.
- 19) Wuhmann, Wunderly e De Nicola: « Rec. Progr. in Med. », 8, 4, 1950.
- 20) Eichelberger e McClusky: cit. da Poli.
- 21) Poli: « Fisiopatologia e clinica del protidoplasma », Ed. Del-fino, Milano, 1951.
- 22) Cugudda e Pitzus: « Arch. di Tisiol. », VII, 213, 1952.
- 23) Boselli: « Rass. Clin. Scient. », 25, 338, 1949.
- 24) Soragni e Cottafavi: « Acta Paediatr. Latina », 2, 126, 1949.
- 25) Toscano e Andreoni: « Min. Med. », 40, II, 146, 1949.
- 26) De Sario e Nicola: « Min. Ped. », 4, 225, 1952.
- 27) Pafumi e Pustorino: « Riv. Ped. Siciliana », 7, 39, 1952.
- 28) Heilmeyer: « Dtschr. Med. Wsch. », 6, 161, 1949.
- 29) Jahnke e Scholtan: Relaz. al Congresso dell'Ass. Reno-Westfalica di Med. interna, Bonn, 25 maggio 1949.
- 30) Focarelli: « Rass. di Pat. dell'App. Resp. », 2, 39, 1952.
- 31) Robitzek e Selikoff: « Am. Rev. of Tuberc. », 65, 402, 1952.
- 32) Carpi: « Atti della Soc. Lomb. di Sc. Med. e Biol. », 7, 23, 1952.
- 33) Mariani e Cattaneo: « Min. Med. », 43, 1131, 1952.
- 34) Sada: « Atti della Soc. Lomb. di Sc. Med. e Biol. », 7, 123, 1952.
- 35) Sada: « Giorn. It. di Tisiol. », 6, 133, 1952.
- 36) Sada: « Min. Med. », in corso di pubblicazione.
- 37) Caspani: « Arch. Sc. Med. », 94, 3, 1952.

Istituto « Carlo Erba » per Ricerche Terapeutiche  
Laboratorio di Microbiologia

## Sull'associazione fra idrazide isonicotinica e streptomina

Prove in vitro

GIOVANNI CERIOTTI

Nel trattamento delle malattie infettive con chemioterapici ed antibiotici, uno dei problemi più preoccupanti è rappresentato dalla insorgenza di varianti batteriche resistenti.

Il fenomeno è particolarmente accentuato nella terapia antitubercolare, sia per il tipo di trattamento molto prolungato che per la spiccata facilità con cui si generano delle varianti a resistenza molto marcata e molto stabile alla streptomina. Per quanto riguarda l'idrazide dell'acido isonicotinico, le esperienze compiute nel nostro Laboratorio indicano un tipo di resistenza notevolmente diverso da quello della streptomina soprattutto perchè molto meno stabile e ad insorgenza molto irregolare \*).

Comunque l'insorgenza di tale resistenza è stata dimostrata in vitro e sono pure stati isolati dei ceppi resistenti in pazienti sotto trattamento, come pure dei ceppi dotati di resistenza spontanea <sup>1-2-3-4-5-6</sup>.

Per cercare di far fronte al problema della resistenza, in questi ultimi anni è stata studiata l'associazione della streptomina con altri farmaci, e, per il PAS, si è parlato di una azione di ritardo, nell'insorgenza della resistenza alla streptomina <sup>7</sup>. Precedentemente per il M. ranac tale fenomeno era stato osservato anche con il sulfatiazolo <sup>8</sup>. Era quindi logico provare anche l'associazione fra streptomina e idrazide isonicotinica, essendo molto probabile una loro azione sinergica. Dato poi che l'attività dell'idrazide è molto più elevata di quella di tutti gli altri farmaci finora associati alla streptomina, si poteva anche pensare ad maggiore efficacia nell'inibire l'insorgenza di varianti resistenti alla streptomina.

Già da qualche parte è stato segnalato il buon esito dell'associazione dal punto di vista del sinergismo <sup>10</sup> ed è stata pure prospettata la possibilità, sopra accennata, di una inibizione di una selezione di varianti resistenti <sup>9-10</sup>.

Scopo del presente lavoro è quindi quello di studiare:

- 1) la portata della azione di potenziamento;
- 2) l'influenza sulla insorgenza di ceppi resistenti;
- 3) la sensibilità crociata di eventuali ceppi resistenti.

**Parte sperimentale.** — Lo studio è stato condotto in parte sui ceppi H37Rv sensibile e H37Rv4 resistente alla streptomina, coltivati in terreno di Youmans semplice; nella massima parte però esse sono state eseguite col ceppo ATCC 607 in terreno di Youmans addizionato con l'1 % di Tween 80. Tale ceppo, a crescita rapida, dimostra una buona sensibilità alla idrazide isonicotinica ed è usato con ottimi risultati nel nostro laboratorio per il dosaggio biologico di essa <sup>11-12</sup>. L'aggiunta di Tween deter-

\*) Risultati non pubblicati.

minando una crescita diffusa, permette di seguire turbidimetricamente lo sviluppo dei germi e di valutarlo quindi quantitativamente.

Per l'associazione venne usata diidrostreptomicina solfato (Pfeizer) e idrazide isonicotinic purissima (Tibazide Erba). L'esperimento venne condotto secondo lo schema seguente:

Vennero preparate quattro serie di provette contenenti diluizioni scalari di diidrostreptomicina da 100 a 0,1  $\gamma$ /cc. (come base). A ciascuna di queste serie venne poi aggiunta una soluzione di idrazide in modo da avere una concentrazione finale nelle varie serie rispettivamente di 0,25 - 0,5 - 0,1 e 2,0  $\gamma$ /cc. Contemporaneamente vennero allestite delle altre serie contenenti streptomicina e idrazide isolatamente nelle stesse concentrazioni e dei controlli senza tuberculostatici. Tutte le varie provette vennero seminate con 0,01 cc., per cc. di liquido culturale, di una sospensione di ATCC 607 di 24 ore diluita in modo da avere un contenuto di 1 mgr. di germi per cc. determinato in base alla densità ottica a 650  $m\mu$ , allo spettrofotometro di Coleman, con provette aventi 11 mm. di diametro.

Al terzo giorno venivano misurate le densità ottiche dei liquidi delle provette in cui si aveva avuto crescita. La provetta di ciascun gruppo con la concentrazione più alta in idrazide o in streptomicina o nei due farmaci associati, compatibilmente con una densità ottica adatta, veniva usata per la semina del nuovo gruppo di provette corrispondente. Vennero così eseguiti sette passaggi.

Le tabelle e i grafici illustrano sia l'effetto della associazione sul potenziamento dei singoli farmaci sia le modificazioni ottenute nella resistenza del germe dopo tali passaggi in confronto con il ceppo di partenza.

TABELLA I.

	Diidro- streptomicina	Idrazide	Diidrostrepto + Idrazide			
			a	b	c	d
I	1,56	3,12	0,4	0,4	0,2	0,2
VII	2000	12,5	1,56	1,0	0,8	0,4

*Ceppo 607* - Minime concentrazioni in  $\gamma$ /cc. inibenti totalmente lo sviluppo del germe.

*I Ceppo di partenza - VII al settimo passaggio* - Per l'associazione i dati si riferiscono alla diidrostreptomicina. Le lettere a, b, c, d, indicano le concentrazioni di idrazide e cioè 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0  $\gamma$ /cc.

Per i ceppi H37Rv resistente e non resistente alla diidrostreptomicina venne studiato solo l'effetto della associazione sul sinergismo e non sull'instaurarsi della resistenza.

La prova venne eseguita in terreno di Youmans senza Tween, l'inoculo venne fatto con le stesse modalità come per il ceppo 607 e la lettura eseguita dopo 14 e 21 giorni.

TABELLA II.

Diidrostreptomicina	Idrazide	Diidrostreptomicina + Idrazide		
		a	b	c
1,0	0,03	0,4	0,3	0,2

*Ceppo H 37 Rv* - Concentrazioni minime, inibenti completamente lo sviluppo, in  $\gamma$ /cc. Per l'associazione i dati riportati si riferiscono alla concentrazione di diidrostreptomicina. Le lettere a, b, c, indicano le concentrazioni in idrazide e cioè rispettivamente 0,0019, 0,0038, 0,0076  $\gamma$ /cc.

Sia il ceppo 607 reso resistente alla diidrostreptomicina che il ceppo H37Rv4, già resistente, vennero saggiati con la idrazide e con l'associazione dei due farmaci. Si è così potuto osservare che essi sono più sensibili alla idrazide che non il ceppo originario; ciò è particolarmente evidente col ceppo 607. Però nella associazione, l'azione risentita dal germe è unicamente quella della idrazide (fig. 5).

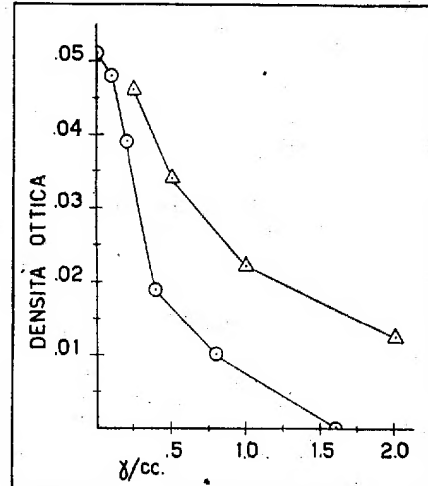


Fig. 1. - Curve di crescita del *M. tuberculosis* ATCC 607 in presenza di concentrazioni crescenti di diidrostreptomicina (O) e di idrazide isonicotinic ( $\Delta$ ) all'inizio dell'esperimento. Sulle ascisse sono riportate le concentrazioni dei due farmaci in  $\gamma$ /cc. e sulle ordinate i valori turbidimetrici della crescita

**Discussione.** — Una analisi dei risultati permette di rilevare anzitutto un potenziamento netto, come risultato della unione dei due farmaci. Infatti l'inibizione completa del ceppo 607 che richiede (tab. I), usando i due prodotti separatamente,  $\gamma$  1,56 per cc. di diidrostreptomicina e  $\gamma$  3,12 di idrazide, può essere già ottenuta con 0,4  $\gamma$ /cc. della prima e 0,25  $\gamma$ /cc. della seconda o 0,2  $\gamma$ /cc. e 1  $\gamma$ /cc. Per il ceppo H37Rv il fenomeno è ancora più evidente. Bastano infatti 0,0019  $\gamma$ /cc. di idrazide per portare da 1 a 0,4  $\gamma$ /cc. la quantità di diidrostreptomicina richiesta per avere l'inibizione completa.

I grafici 1 e 3 permettono di apprezzare il fenomeno meglio che non il solo dato della inibizione totale. Essi infatti mettono in evidenza variazioni della crescita già per concentrazioni subinibenti, che sono un indice più sensibile della diversa influenza delle varie dosi.

Il secondo fenomeno, che si rileva con ancor maggiore evidenza, è quello della inibizione dell'insorgenza di varianti resistenti sia all'uno che all'altro farmaco usati insieme, mentre con lo stesso numero di passaggi si ottiene una variante resistente a più di 2000  $\gamma$ /cc. di diidrostreptomicina e a più di 6  $\gamma$ /cc. di idrazide. Come si era rilevato all'inizio, l'instaurarsi della resistenza all'idrazide, con il ceppo 607, è abbastanza lenta e inoltre, durante i vari passaggi, si sono notate frequenti oscillazioni di sensibilità. La resistenza non è mai apparsa, nel corso di queste esperienze, superiore a quella indicata. Un confronto fra le fig. 3 e 4, permette di rilevare un certo aumento di resistenza ma di grado molto lieve anche in presenza d'idrazide.

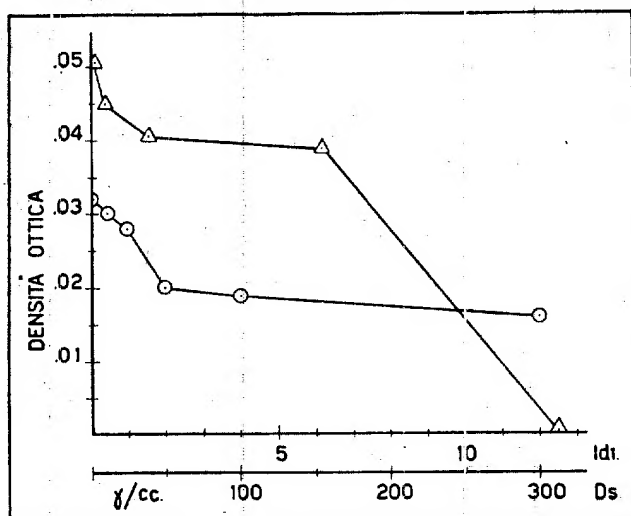


Fig. 2.

Fig. 2. - Curve di crescita del *M. tuberculosis* ATCC 607 in presenza di concentrazioni crescenti di diidrostreptomicina (O) e di idrazide isonicotinica (Δ) al settimo passaggio. La scala superiore delle ascisse (Idr.) è quella dell'idrazide, l'inferiore (Ds) quella della diidrostreptomicina. — Fig. 3. - Associazione fra diidrostreptomicina e idrazide isonicotinica. Valori al principio dell'esperimento. Sulle ascisse sono riportate le concentrazioni di diidrostreptomicina in  $\gamma/cc.$ . Le curve a, b, c, d corrispondono alle diverse concentrazioni di idrazide presenti nel terreno di cultura e precisamente a = 0,25, b = 0,50, c = 1,0, d = 2  $\gamma$  di idrazide per cc.

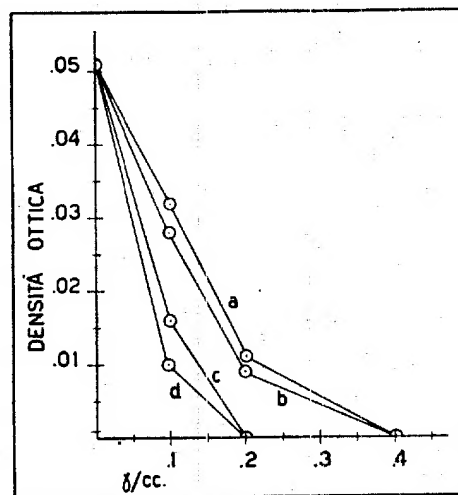


Fig. 3.

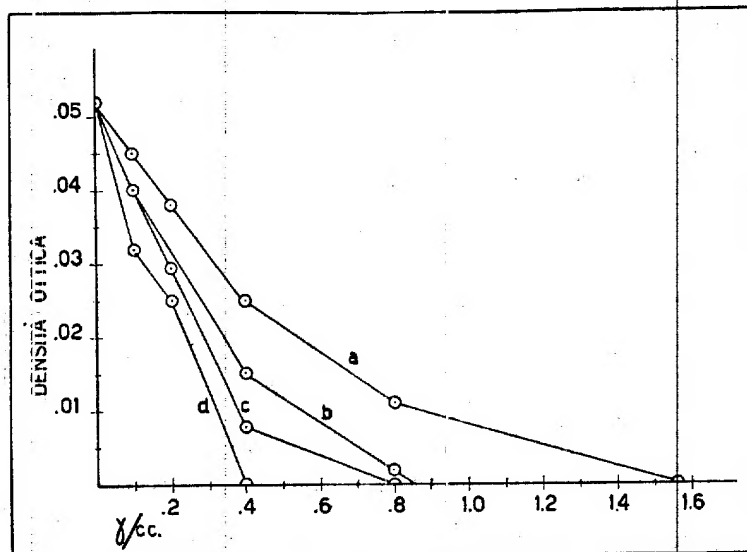


Fig. 4.

Fig. 4. - Associazione fra diidrostreptomicina e idrazide isonicotinica. Valori al settimo passaggio. Sulle ascisse sono riportate le concentrazioni di diidrostreptomicina in  $\gamma/cc.$ . Le curve a, b, c, d, corrispondono alle diverse concentrazioni di idrazide presenti nel terreno di cultura e precisamente a = 0,25, b = 0,50, c = 1,0, d = 2  $\gamma$  di idrazide per cc. — Fig. 5. - Differenza di resistenza alla idrazide del ceppo ATCC 607 diidrostreptomicino sensibile (Δ) e diidrostreptomicino resistente (O) da questo derivato. L'andamento della crescita del ceppo diidrostreptomicino resistente in presenza di concentrazioni crescenti di idrazide, non è influenzato dalla presenza di diidrostreptomicina (25  $\gamma/cc.$ ) (□).

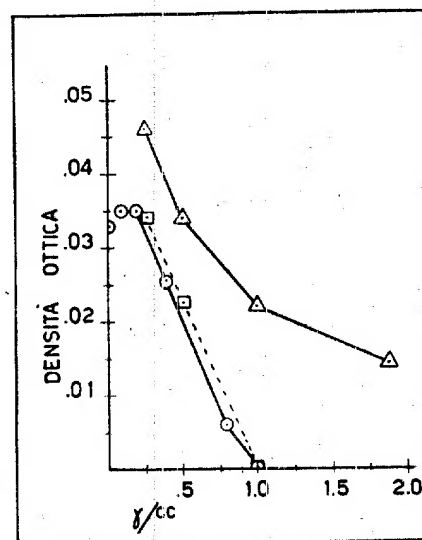


Fig. 5.

Comunque, le modificazioni che si riscontrano nel ceppo trattato con ambedue i farmaci contemporaneamente, dopo sette passaggi, sono assolutamente trascurabili, qualora vengano confrontate con quelle che si osservano quando lo stesso ceppo sia stato trattato, per lo stesso numero di passaggi, con gli stessi farmaci separatamente (fig. 1 e 2). Ciò vale in modo particolare per la diidrostreptomicina.

Contrariamente a quanto avviene per i ceppi sensibili, l'associazione non dimostra alcun effetto su quelli resistenti alla diidrostreptomicina. Tale fenomeno si è potuto mettere in evidenza sia col ceppo 607 che con l'H37Rv4. Con tali ceppi l'inibizione più o meno accentuata della crescita è in funzione puramente

della concentrazione di idrazide presente, e non viene assolutamente influenzata variando la concentrazione di diidrostreptomicina (fig. 5).

Lo studio del comportamento dei ceppi resistenti alla diidrostreptomicina in confronto con quelli originali permette di mettere in evidenza oltre alla già ben nota lentezza di crescita, anche una maggiore sensibilità alla idrazide.

Tale maggiore sensibilità alla idrazide di ceppi resistenti alla diidrostreptomicina in confronto a quelli ad essa sensibili, porta ad ammettere la possibilità che un trattamento ripetuto con idrazide a dosi subinibenti di un ceppo diidrostreptomicino-resistente, induca un ritorno della sensibilità alla diidro-



streptomycin, favorendo la selezione di eventuali mutamenti retrocessivi. Tale possibilità non è stata però finora controllata sperimentalmente.

**Conclusioni.** — In base alle esperienze sopradescritte si possono trarre le seguenti conclusioni:

1) Si osserva in vitro sia sul ceppo 607 che H37Rv un potenziamento fra l'azione della diidrostreptomycin e quella della idrazide isonicotinica.

2) L'associazione ostacola la formazione di varianti resistenti.

3) I ceppi resistenti alla diidrostreptomycin non traggono alcun beneficio dalla associazione.

4) Tali ceppi sono però più sensibili alla idrazide.

Tali conclusioni sono valide attualmente solo per quanto riguarda le prove in vitro. Esse possono tuttavia suggerire l'opportunità di una associazione dei due farmaci nell'uso clinico soprattutto allo scopo di prevenire l'insorgenza di varianti resistenti.

Merita ulteriore approfondimento la questione se il trattamento con idrazide di ceppi resistenti alla diidrostreptomycin possa determinare, favorendo una mutazione retrograda, la ricomparsa della sensibilità a tale farmaco.

Ringrazio vivamente la Sig.na Emma Berti ed il Sig. Franco Borghi per la loro attiva ed efficace collaborazione.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) Steenken W. Jr., Meade G. M., Wolinsky E., Coates O. E. Jr.: Demonstration of increased drug resistance of tubercle bacilli from patients treated with hydrazines of isonicotinic acid, « Am. Rev. Tuberc. », 65, 654, 1952.
- 2) Daddi G.: Ricerche sulla resistenza dei b. di Koch nei confronti dell'isonicotinilidrazide, « Atti Soc. Lomb. Sc. Med. e Biol. », 7, 68, 1952.
- 3) Buck M. e Schnitzer R. J.: The development of drug resistance of M. tuberculosis to isonicotinic acid hydrazide, « Am. Rev. Tuberc. », 65, 759, 1952.
- 4) Pansy F., Stander H. e Donovick R.: In vitro studies on isonicotinic acid hydrazide, « Am. Rev. Tuberc. », 65, 761, 1952.
- 5) Szibalski W. e Bryson V.: Bacterial resistance studies with derivatives of isonicotinic acid, « Am. Rev. Tuberc. », 65, 768, 1952.
- 6) Hobby G. L. e Lener T. F.: Resistance to isonicotinic acid hydrazide, « Am. Rev. Tuberc. », 65, 771, 1952.
- 7) Kitamoto C. e Rist N.: Sur le mécanisme d'action de l'association PAS-Streptomycine, « Rev. de la Tuberc. », 15, 950, 1951.
- 8) Middlebrook G. e Yegian D.: Certain effects of streptomycin on Mycobacteria in vitro, « Am. Rev. Tuberc. », 64, 553, 1946.
- 9) Middlebrook G.: Sterilization of tubercle bacilli by isonicotinic acid hydrazide and the incidence of variants resistant to the drug in vivo, « Am. Rev. Tuberc. », 65, 765, 1952.
- 10) Ilavsky J.: Synergistic action of isonicotinic acid hydrazide and streptomycin in vitro, « Am. Rev. Tub. », 65, 777, 1952.
- 11) Ceriotti G.: Dosaggio microbiologico dell'Idrazide dell'acido isonicotinico, « Atti Soc. Lomb. Sc. Med. Biol. », 7, 76, 1952.
- 12) Ceriotti G.: Sul dosaggio dell'idrazide dell'acido isonicotinico, « Rendiconti VIII Congr. Microb. », Milano, (in corso di stampa), 17-19 aprile 1952.

Istituto « Carlo Erba » per Ricerche Terapeutiche  
Laboratorio di Microbiologia

## Sull'associazione fra idrazide isonicotinica e streptomycin

Osservazioni farmacologiche

GIOVANNI CERIOTTI

**Introduzione.** — In una precedente nota si è messo in evidenza l'effetto sinergico in vitro, fra idrazide isonicotinica e diidrostreptomycin. In tali ricerche era stata evitata l'associazione fra idrazide e streptomycin perchè, data la reattività della streptomycin con reattivi dei gruppi carbonilici, era già possibile a priori sospettare la possibilità della formazione di composti con attività ridotta e quindi una diminuzione della efficacia della associazione.

Successivamente, però, si è ritenuto opportuno di sottoporre questa ipotesi al controllo sperimentale, soprattutto in considerazione del fatto, che in alcuni casi, quali ad esempio il trattamento della meningite tuberculare, la streptomycin viene preferita alla diidrostreptomycin.

Si è quindi proceduto a tre diversi gruppi di esperimenti e cioè:

1) Prova della tossicità della streptomycin, della diidrostreptomycin e delle loro associazioni con idrazide.

2) Prova della attività in vitro della streptomycin e della diidrostreptomycin e della loro associazione con idrazide, su un germe insensibile alla idrazide.

3) Analisi cromatografica dell'associazione.

#### Parte sperimentale.

1) **Prova di tossicità.** — Vennero usati topi albini del peso medio di 20 g.  $\pm$  1,5 g. La DL<sub>50</sub> fu determinata per iniezione endovenosa rapida delle soluzioni a varie concentrazioni, nel volume costante di 0,5 cc. di soluzione fisiologica.

Venne usata, come in tutti gli altri esperimenti, streptomycin solfato Schenley e diidrostreptomycin solfato Pfeizer e idrazide Erba (Tibazide).

La concentrazione venne calcolata come base (1,25 mgr. di solfato corrisponde a 1,0 mgr. di base) e la mescolanza fu sempre eseguita nel rapporto di tre parti di antibiotico per una di idrazide.

Tutte le soluzioni vennero eseguite in soluzione fisiologica per diluizione sempre dalle stesse soluzioni madre contenenti la mescolanza o gli antibiotici isolati.

Si usarono in totale 200 topi. Le DL<sub>50</sub> vennero determinate con metodo grafico sulle carte di probabilità di Prigge e Schäffer. I risultati di queste prove, esposti nella tabella, dimostrano che non vi è alcuna modificazione della DL<sub>50</sub> della diidrostreptomycin per aggiunta dell'idrazide, mentre l'aggiunta dell'idrazide alla streptomycin provoca un aumento netto di tossicità.

	Strepto.	Strepto. + idrazide	Diidro- strepto	Diidrostrepto + idrazide
DL <sub>50</sub> mgr./Kg.	107,5	77,5	187,5	180,0

2) *Attività in vitro.* — Venne usato un metodo su piastra per il dosaggio della streptomycin, che è stato adottato nel nostro laboratorio anche per il dosaggio della diidrostreptomycin.

Tale metodo, basato sulla misura del diametro degli aloni di inibizione alle varie concentrazioni in antibiotico permette delle valutazioni molto accurate. In esso si utilizza, come germe test, il *B. subtilis* ATCC 6633.

Tale germe, molto sensibile alla streptomycin e ancora di più alla diidro, è insensibile alla idrazide anche in forti concentrazioni. E' possibile in tal modo valutare isolatamente l'azione dei due antibiotici e rilevare le perdite di attività senza che eventuali fenomeni di sinergismo con la idrazide possano alterare i risultati.

In queste esperienze, per poter mettere in evidenza più nettamente il fenomeno, la quantità di idrazide presente è stata aumentata in confronto alla prova di tossicità, infatti il rapporto fra antibiotici e idrazide è stato portato da 2 a 1.

Le diluizioni furono praticate in modo da arrivare ai valori di concentrazione ottimale per l'azione degli antibiotici in prova e cioè a 1  $\gamma$ /cc. per la streptomycin e a 0,4  $\gamma$ /cc. per la diidrostreptomycin.

Le soluzioni concentrate vennero eseguite in soluzione fisiologica, come per la prova di tossicità, mentre per le diluizioni ulteriori si fece ricorso a tampone a pH 3, come è indicato nel metodo di dosaggio.

I pozzetti contenenti la miscelanza venivano alternati con pozzetti contenenti l'antibiotico alla stessa concentrazione.

I risultati ottenuti in questa esperienza hanno confermato l'ipotesi avanzata all'inizio.

Infatti l'azione della streptomycin è diminuita del 30 % mentre quella della diidrostreptomycin è rimasta inalterata.

3) *Cromatografia su carta.* — Le prove biologiche sopra riportate inducono a pensare alla formazione di un composto tossico e di attività ridotta fra streptomycin e idrazide isonicotinica quando queste due sostanze siano mescolate fra di loro in acqua.

Tale composto è, presumibilmente, un idrazone che si forma per reazione del gruppo idrazidico dell'idrazide isonicotinica col gruppo carbonilico della streptomycin; esso non si ha infatti con la diidrostreptomycin in cui il gruppo carbonilico è assente.

Per evidenziare la formazione di tale composto in un caso e la sua assenza nell'altro, si è ricorso alla cromatografia su carta.

A tale scopo si è usato, con lievi modifiche, un metodo messo a punto, nei nostri laboratori dal Dott. De Franceschi, per lo studio cromatografico della idrazide e dei suoi derivati.

In questo metodo, descritto altrove<sup>1</sup>, il solvente è rappresentato dall'alcool isoamilico contenente l'1,5 % di acido acetico. Nelle presenti esperienze, al solvente, dopo saturazione con acqua, è stato aggiunto alcool etilico nella proporzione del 40 %.

La prova fu eseguita su una soluzione acquosa contenente 1000  $\gamma$  di streptomycin o, rispettivamente, di diidrostreptomycin e 500  $\gamma$  di idrazide per cc. Le soluzioni vennero lasciate a temperatura ambiente per due ore; quindi 0,04 cc. di ognuna delle due

soluzioni vennero cromatografate parallelamente ad una uguale quantità di una soluzione di idrazide alla stessa concentrazione. Sia con la osservazione nell'ultravioletto che dopo reazione col bromuro di cianogeno, si è potuto osservare che, per la soluzione in cui si ha presenza di streptomycin, l'idrazide appare come una macchia ben distinta avente il suo R caratteristico, però d'intensità più debole che nel controllo. Inoltre nel punto di applicazione del liquido appare una macchia ben visibile nell'ultravioletto che dà la reazione del bromuro di cianogeno e che manca nel controllo con idrazide più diidrostreptomycin. Si ha cioè la separazione netta dell'idrazone formatosi per la reazione fra streptomycin e idrazide.

Oltre che mediante la osservazione nell'ultravioletto e la reazione al bromuro di cianogeno, le cromatografie vennero studiate anche mediante sviluppo su piastra di agar germi, usando a tale scopo il ceppo 607.

In tal modo è possibile apprezzare in modo semi-quantitativo le eventuali perdite di attività dell'idrazide oltre che quelle della streptomycin.

Per quest'ultima si è confermato il dato già ottenuto sul *subtilis*, e si è effettivamente constatata anche la diminuzione di attività dell'idrazide.

Nonostante la perdita di attività sia della streptomycin che della tibazide; l'azione sinergica permane.

Essa è stata provata nello stesso modo di quella della diidrostreptomycin con l'idrazide<sup>2</sup> e le differenze con quest'ultimo tipo di associazione non risultano evidenti.

Ciò dipende dal fatto che rimangono sempre libere quantità tali dei due prodotti per cui la loro azione sinergica è sufficiente a mascherare le perdite avvenute.

Infatti, nelle condizioni da noi adottate, di due parti di streptomycin per una parte di tibazide, anche dopo la formazione dell'idrazone inattivo, si ha ancora libero il 70 % della streptomycin e il 86 % di idrazide.

**Conclusioni.** — L'associazione fra l'idrazide isonicotinica e la streptomycin offre indubbiamente dei vantaggi per quanto riguarda il potenziamento della attività dei singoli farmaci e l'ostacolo alla insorgenza di ceppi resistenti.

E' necessario tuttavia richiamare l'attenzione sul fatto che sia dal punto di vista tossicologico che da quello dell'attività l'associazione è molto più vantaggiosa qualora essa invece che fra idrazide e streptomycin semplice, venga fatta fra l'idrazide e la diidrostreptomycin.

In questo caso infatti non esiste la possibilità della formazione di quei composti inattivi e tossici la cui comparsa è stata qui documentata per quanto riguarda la streptomycin, e che si formano presumibilmente per reazione fra il gruppo carbonilico della streptomycin e il gruppo idrazidico.

Indubbiamente non tutta l'idrazide si lega, perché altrimenti scomparirebbe l'azione sinergica, ma si crea probabilmente un equilibrio tra i vari componenti che permette ancora lo svolgersi di tale azione.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) De Franceschi A.: (in corso di stampa).
- 2) Ceriotti G.: « Minerva Medica ».

- 2 -

~~CONFIDENTIAL~~

6. "Argentine fuel oil requirement, which drew no bids yesterday in New York, reportedly attracted bids, in Buenos Aires, from three other major world marketers. These bids, according to trade advices, were 'low OILGRAM, date of lifting' at Caribbean plants, with one limited to about four T2 lots, and others for entire 1,755,000-bbl quantity."

-END-

~~CONFIDENTIAL/US OFFICIALS ONLY/SECURITY INFORMATION~~

25X1A2g

~~CONFIDENTIAL~~  
Security Information

This unclassified information for US Officials  
Only is supplied for the possible interest of  
your analysts. It does not warrant dissemination by